

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

**0 338 437**  
**A2**

(12)

# **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 89106628.4

(51) Int. Cl.4: **C07K 7/00 , A61K 37/02**

(22) Anmeldetag: 13.04.89

(30) Priorität: 22.04.88 DE 3813821

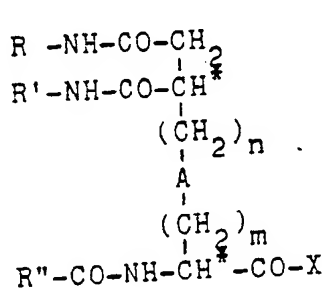
(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
25.10.89 Patentblatt 89/43(64) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)(72) Erfinder: Wiesmüller, Karl-Heinz  
Rappenhalde 33  
D-7400 Tübingen(DE)  
Erfinder: Hess, Günter, Dr. Dr.  
Ravensteynstrasse 75  
D-4500 Koblenz(DE)  
Erfinder: Jung, Günther, Prof. Dr.  
Ob der Grafenhalde 5  
D-7400 Tübingen(DE)

(54) Synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche und Verfahren zu deren Herstellung..

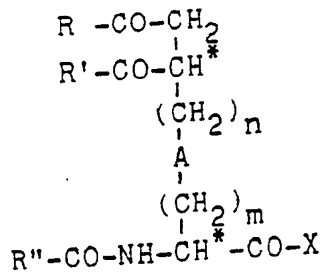
(57) Eine synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche wird gebildet durch Konjugation mindestens einer Membranankerverbindung mit mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Klauenseuche-Virus. Die genannte Vakzine hat den Vorteil, daß sie auch ohne Kühlung sehr lange haltbar ist und daß sie aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit bereits nach einmaliger Applikation einen ausreichenden Schutz gegen die Maul- und Klauenseuche erzeugt.

**EP 0 338 437 A2**

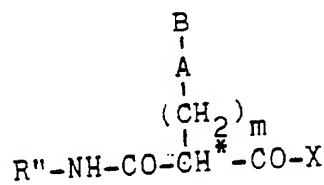




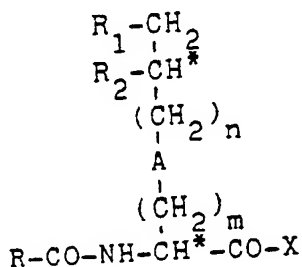
IV.



V.



VI.



VII.

in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH<sub>2</sub>-) oder -NH- sein kann;

n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

C\* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration, R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen ist, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- (substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von 1 bis 10 Aminosäuren ist, an die die Partialsequenz des Virus gebunden ist.

Von diesen sind als Beispiele besonders hervorzuheben: In bakteriellem Lipoprotein vorkommende N-Termini, wie z.B.: Y-Ser-Ser-Ser-Asn, Y-Ile-Leu-Leu-Ala, Y-Ala-Asn-Asn-Gln, Y-Asn-Ser-Asn-Ser, Y-Gly-Ala-Met-Ser, Y-Gln-Ala-Asn-Tyr, Y-Gln-Val-Asn-Asn, Y-Asp-Asn-Ser-Ser, wobei Y eine der unter Formel I bis VII aufgeführten Reste sein kann. Diese Lipopentapeptide können auch in verkürzter Form (Lipodi, Lipotri oder Lipotetrapeptide) als Membranankerverbindung eingesetzt werden. Ganz besonders bevorzugt ist N-Palmitoyl-S-[2,3(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-seryl-serin (Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser), N-Palmitoyl-S-[2,3(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-glycin und N-Palmitoyl-S-[2,3-(bis-palmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-alanyl-D-isoglutamin. Beispiele weiterer bevorzugter Membrananker-  
verbindungen finden sich in der DE-OS 35 46 150.

Als Partialsequenzen des MKS-Virus, die an die Membranankerverbindung gebunden werden, können viele verschiedene Partialsequenzen eingesetzt werden. Bevorzugt sind die Partialsequenzen:

Partialsequenz -(134-154)

" -(135-154)

" -(134-158)

" -(134-160)

" -(141-160)

" -(141-158)

" -(200-213)

" -(200-210)

" -(161-180)

wobei die Sequenzen aller bekannten Serotypen und Subtypen verwendet werden können. Als beispielhafte Serotypen seien in diesem Zusammenhang angegeben:

Serotyp A:	134	160
A <sub>5</sub> Westerwald	NKYSTGGP--RRGDMGSAAARAANKQLP	
	161	180
	ASFNYGAIRAITIHELLVRM	
	200	213
	RHKQKIIAPARQLL	

A<sub>12</sub> USA

134

160

NKYSASGSG-VRGDFGSLAPRVARQLP

161

180

ASPNYGAIKAEITHELLVRM

200

212

RHKQKIIAPGKQL

Serotyp C:

134

160

C<sub>1</sub> Oberbayern

TTY TAST ----RGDLAHLTAT RAGHLP

161

180

TSFNFGAUKAETITGLLVAM

200

213

RHKQPLVAPAKQLL

Serotyp O:

134

160

O<sub>1</sub> Kaufbeuren

CRYNRNAVPNLRGDLQVLAQKVARTLP

O<sub>1</sub> Lausanne

CRYSRNAVPNLRGDLQVLAQKVARTLP

O<sub>2</sub> Normandie

RRYSRNAVPNVRGDLQALGQKARTLP

O Wuppertal

CLYSDARVSNVRGDLQVLAQKAERAL

O Israel

CRYGNVAVTNVRGDLQVLAQKAERALP

200

213

O<sub>1</sub> Kaufbeuren

RHKQKIVAPVKQTL

161

180

O<sub>1</sub> Kaufbeuren

TSFNNGAIKATRVTELLYRM

Besonders geeignet sind synthetische Vakzine, die aus einer Mischung von Peptiden aus verschiedenen Sero- und/oder Subtypen des Maul- und Klauenseuche-Virus bestehen, die jeweils kovalent an die Membranankerverbindung(en) gebunden sind.

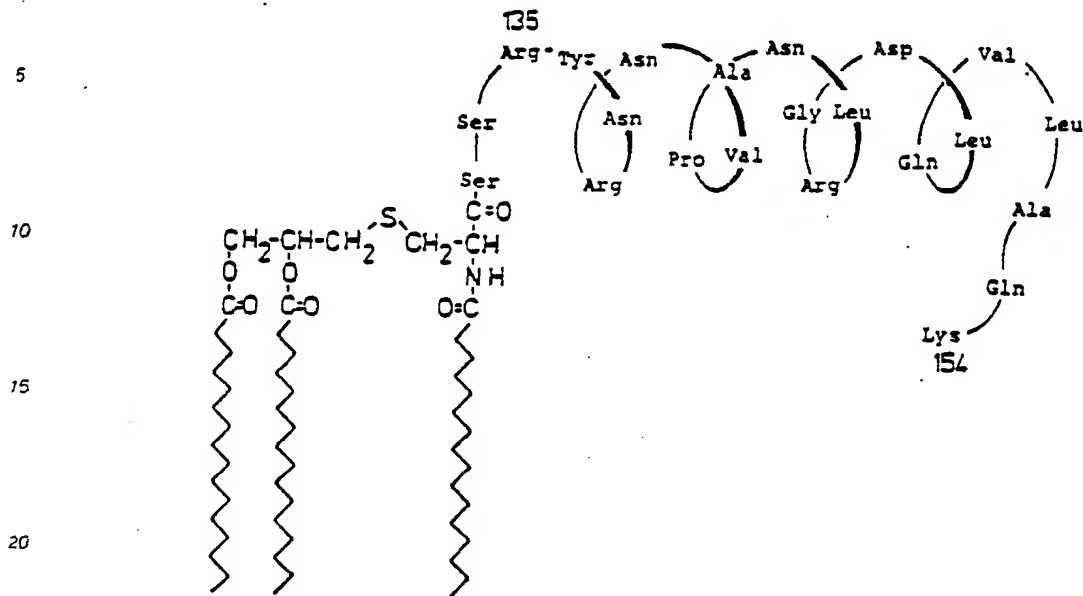
Besonders bevorzugt sind synthetische Vakzine, die aus einer Mischung von Sequenzen VPI 134-160 der Serotypen O, A, C, gebunden an die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-serin, bestehen.

Bei Verwendung der Sequenz 134-154 vom Serotyp O und der Sequenz 134-155 vom Serotyp A kann dieselbe, soweit sie C-terminales Lysin enthält, über die ε-Aminogruppe mit der Membranankerverbindung kovalent verknüpft werden.

Als besonders geeignet haben sich erfindungsgemäße synthetische Vakzine erwiesen, die die Partialsequenz des MKS-Virus VP 1(135-154) enthalten.

Besonders bevorzugt ist weiterhin eine Vakzine bestehend aus N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-

propyl]-cysteinyl-seryl -seryl-VP 1 (135-154), d.h. die Verbindung der nachstehenden Formel.



Die Membranankerverbindungen können grundsätzlich als R,S-, R,R-Diastereomere oder als Diastereomengemisch vorliegen. Es hat sich allerdings gezeigt, daß die Vakzinen, die eine R,R-diastereomere Membranankerverbindung enthalten, eine besonders hohe Wirksamkeit zeigen.

Erfindungsgegenstand ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine, das dadurch gekennzeichnet ist, daß Partialsequenzen des MKS-Virus durch eine Konjugationsreaktion an die Membranankerverbindung gebunden wird. Die Konjugationsreaktion kann z.B. eine Kondensation, Addition, Substitution, Oxidation oder Disulfidbildung sein. Bevorzugte Konjugationsmethoden sind in Beispiel 1 wiedergegeben. Weitere Konjugationsmethoden sind in der bereits zitierten deutschen Offenlegungsschrift 35 46 150 beschrieben.

Die Herstellung der Membranankerverbindungen ist ebenfalls in der zuletzt genannten deutschen Offenlegungsschrift ausführlich beschrieben.

Die gegebenenfalls nötige Trennung der Diastereomeren kann nach unterschiedlichen Methoden, wie z.B. in Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364 (1983) 593 beschrieben erfolgen. In Beispiel 2 ist ein bevorzugtes Trennverfahren beschrieben.

Der Aufbau der Partialsequenzen der jeweiligen MKS-Proteine kann auf unterschiedliche, literaturbekannte Weise erfolgen, vgl. z.B. Wünsch et al. in Houben-Weyl, Bd. 15/1.2, Stuttgart, Thieme-Verlag oder Wünsch in Angew. Chem. 83 (1971), 773, E. Gross und J. Meienhofer (Herausgeb.), The Peptides, Vol. 1 (1979), 2 (1979), 3 (1981) und 5 (1983) Academic Press, New York oder die deutsche Offenlegungsschrift 35 46 150. In Beispiel 3 wird ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung einer Partialsequenz und eines Konjugats näher erläutert.

Weiterhin gehören zum Erfindungsgegenstand pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitungen, die einen Gehalt an Konjugat aus Membranankerverbindung und Partialsequenz eines MKS-Virus aufweisen. Normalerweise werden zusätzlich neben einem Lösungsmittel keine zusätzlichen Hilfs- und Trägerstoffe oder Adjuvantien für die erfindungsgemäßen Zubereitungen benötigt. In manchen Fällen kann es aber sinnvoll sein, derartige Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie gegebenenfalls Adjuvantien den erfindungsgemäßen Zubereitungen zuzusetzen. Das Mischen und Abfüllen der betreffenden Stoffe erfolgt nach dem Fachmann bekannten Verfahren.

Die Menge an Vakzine, die für eine sichere Immunisierung eines Tieres notwendig ist, hängt ab von der Tierart, der bzw. den Membranankerverbindungen und der bzw. den Partialsequenzen des MKS-Virus und ist im Einzelfall empirisch zu ermitteln. Für die sichere Immunisierung eines Meerschweinchens gegen den MKS-Virus-Serotyp 0:K genügt z.B. eine einmalige Verabreichung von ca. 100 - 500 µg von erfindungsgemäßer Vakzine, ohne weitere Hilfs- oder Trägerstoffe.

Weiterhin gehört zum Erfindungsgegenstand die Verwendung der beschriebenen Vakzine zur Erzeugung von Antikörpern in Säugetieren.

## Beispiel 1

Konjugation von Peptiden/Proteinen mit Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser-OSu bzw. Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser-OH

5

## 1. Peptide und Proteine löslich in DMF

2 µMol Peptid/Protein werden in 0,5 - 1 ml DMF gelöst und 8 µMol (9,2 mg) festes Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser-OSu zugegeben. Durch leichtes Erwärmen und beschallen wird eine homogene Lösung erhalten und es werden 4 µMol organische Base (N-Ethylmorpholin) zugegeben. Nach 12 h Rühren werden 1 - 2 ml Chloroform:Methanol (1:1) zugegeben und es wird 2 h im Eisbad gekühlt.

Das Sediment wird mit 1 ml kaltem Chloroform:Methanol (1:1) gewaschen in tert-Butanol/Wasser (3:1) aufgenommen (evtl. beschallen) und lyophilisiert.

15

## 2. Peptide und Proteine löslich in Wasser

2 µMol Peptid/Protein werden in 0,8 ml Wasser gelöst und mit 4 µMol (4,5 mg) Pam<sub>3</sub>Cys-Ser-Ser-OH versetzt. Es wird gründlich beschallt bis eine Emulsion entsteht und ein pH-Wert von 5,0 bis 5,5 eingestellt. Nach Zugabe von 5 mg EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethyl-carbodiimid-hydrochlorid), gelöst in 100 µl H<sub>2</sub>O, wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend zweimal gegen je 1 l dest. H<sub>2</sub>O dialysiert. Der Inhalt des Dialyseschlauches wird lyophilisiert.

25

## Beispiel 2

Trennung der Diastereomeren von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bis-palmitoyloxy)propyl]-cystein-tert.-butylester (Pam<sub>3</sub>Cys-OBu<sup>t</sup>):

2 g Pam<sub>3</sub>Cys-OBu<sup>t</sup> werden in 10 ml Laufmittel, Dichlormethan/Essigester (20:1), gelöst und auf eine Säule (Länge 120 cm, Durchmesser 4 cm) gefüllt mit MN-Kieselgel 60, 0,063-0,2 mm/70 - 230 mesh ASTM, aufgetragen. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 2 Tr./sec werden 350 Fraktionen a 10 ml gesammelt und ein Aliquot jeder Fraktion nach Chromatographie auf Kieselgel 60-Platten in Dichlormethan/Essigester (20:1) und Anfärbung mit Chlor/TDM Reagenz auf Pam<sub>3</sub>Cys-OBu<sup>t</sup> geprüft.

Fraktionen 280 - 315 enthalten das R,R-Diastereomere, Fraktionen 316 - 335 eine Mischung aus R,R und R,S und Fraktionen 336 - 354 das R,S Diastereomere von Pam<sub>3</sub>Cys-OBu<sup>t</sup>. Nach Abdampfen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, Aufnehmen des Rückstandes in warmem tert.-Butanol und Lyophilisieren erhält man 600 mg R,R-, 370 mg Mischung aus R,R- und R,S- und 540 mg R,S-Pam<sub>3</sub>Cys-OBu<sup>t</sup>.

40

## Beispiel 3

45

## Synthese von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-seryl-VP 1 (135-154)

Die VP 1 Peptidsequenz des MKS-Virus Serotyp 0<sub>1</sub>K wurde durch Festphasen-Peptidsynthese synthetisiert. Es wurden Fmoc Aminosäuren benutzt. Folgende Seitenkettenschutzgruppen kamen zur Anwendung: Lys(Boc), His(Fmoc), Arg(Mtr), Ser(tBu), Tyr(tBu). Ausgehend von 1 g p-Benzoyloxybenzylalkohol-Harz, beladen mit Fmoc-Lys(Boc)-OH (0,47 mmol/g) wurden folgende Synthesenzyklen durchlaufen:

N-Aktivierung mit 55 % Piperidin in N-Methylpyrrolidon (1 x 2 Min, 1 x 5 Min), Präaktivierung von Fmoc-A-A-OH (1,5 mmol) in N-Methylpyrrolidon (6 ml) mit Diisopropylcarbodiimid (1,5 mmol) und 1-Hydroxybenzotriazol (1,5 mmol) mit anschließender Kupplung für 1,5 Std. Nach Waschen mit N-Ethylmorpholin (5 % in N-Methylpyrrolidon) wurden Präaktivierung und Kupplung wiederholt. Die Blockierung von nicht umgesetzten Aminogruppen wurde mit Acetanhydrid (2,5 mmol) und Diisopropylamin (1,2 mmol) in N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde das Peptid-Harz mehrfach mit N-Methylpyrrolidon

don, Dichlormethan und erneut mit N-Methylpyrrolidon gewaschen.

Nach der Synthese der harzgebundenen MKS-Virus-Sequenz wurde ein Teil des Peptids durch Trifluoressigsäurespaltung gewonnen und überprüft mittels HPLC, MS, Aminosäurenanalyse, Analyse auf chiraler Phase sowie Sequenzanalyse. Nachdem 2 Serinreste an das harzgebundene Peptid gebunden wurden, erfolgte die Kupplung des Tripalmitoyl-S-glycerylcysteins. Nach 4 Stunden wurde 1 Äquivalent N-Methylmorpholin hinzugefügt und nach einer weiteren Stunde wurde das Lipopeptid-Harz gewaschen. Das Lipopeptid wurde vom Harz mittels 2 ml Trifluoressigsäure (mit 100 µl Thioanisol) innerhalb von 4 1/2 Stunden getrennt. Das Filtrat wurde eingedampft, der Rückstand mit Essigsäure aufgenommen und in kalten Ether gegeben. Das ausgefallene Lipopeptid wurde 3 x mit Ether gewaschen. Weitere Reinigung wurde erzielt durch Umkristallisation aus Trifluoroethanol/Chloroform im Verhältnis 1:3 mit kaltem Aceton und einigen Tropfen Wasser. Das Lipopeptid wurde aus tert.-Butanol/Wasser im Verhältnis 3:1 lyophilisiert.

#### Beispiel 4

#### Wirksamkeitstest

Zufällig ausgewählte Meerschweinchen mit einem Gewicht von 450 bis 500 g wurden intramuskulär oder subkutan geimpft. 0,5 mg der lyophilisierten Vakzine (N-Palmitoyl-S-[(2R,R)-2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-seryl-seryl-VPI(135-154) wurden emulsifiziert in 500 µl einer 1:1-Mischung aus 0,05 M Phosphatpuffer und Intralipid<sup>(R)</sup> (Kabi Vitrum, Schweden). Die Mischung wurde für 10 s beschallt. Vier Tiere wurden mit dem MKS-Virus infiziert, indem ihnen in die linke Hinterpfote mindestens 500 Meerschweinchen-Einheiten eines virulenten O<sub>1</sub>K FMD-Virus 21 Tage nach der Impfung subkutan injiziert wurden. Als Kontrollen wurden Tiere herangezogen, denen an Stelle des Impfstoffs die Membranankerverbindung, bzw. Phosphatpuffer injiziert worden war. Bei allen geimpften Tieren wurde ein hoher Titer neutralisierender Antikörper  $\log_{10} \text{SN}_{50}$  von 0,36 gefunden. Die Kontroll-Tiere hatten keinen Antikörper-Titer (Blindwert 0,17). Der Titer der neutralisierenden Antikörper wurde bestimmt als Logarithmus der Serum-Verdünnung, die notwendig war, um 50 % der Viruszellen in einer einlagigen Schicht von BHK-(Baby Hamster Kidney)-Zellen zu neutralisieren. Bei den geimpften Tieren konnten mittels Anti-Peptid ELISA-Assays (A<sub>492</sub>) Antikörper nachgewiesen werden, was bei den nicht geimpften Tieren nicht möglich war. Geimpfte Tiere zeigten keine Sekundärläsionen, während alle nicht geimpften Tiere das Vollbild der Maul- und Klauenseuche-Infektion zeigten.

#### Ansprüche

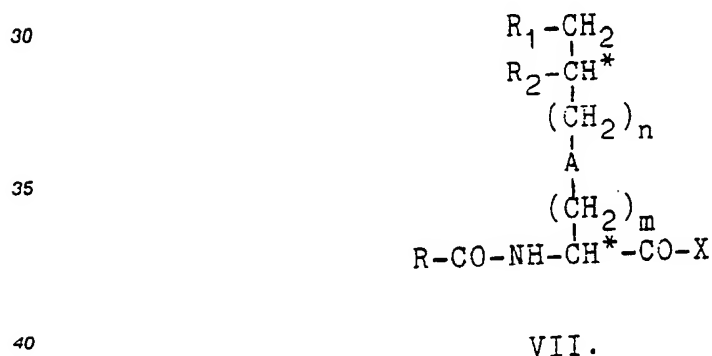
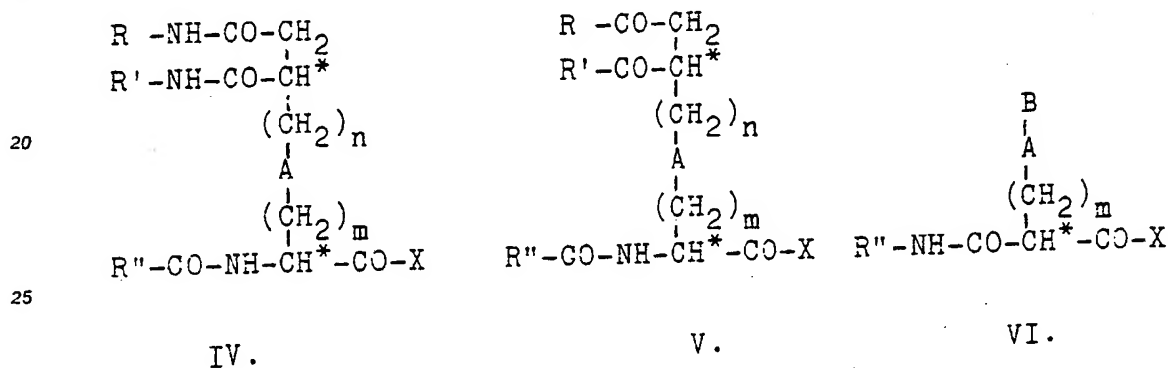
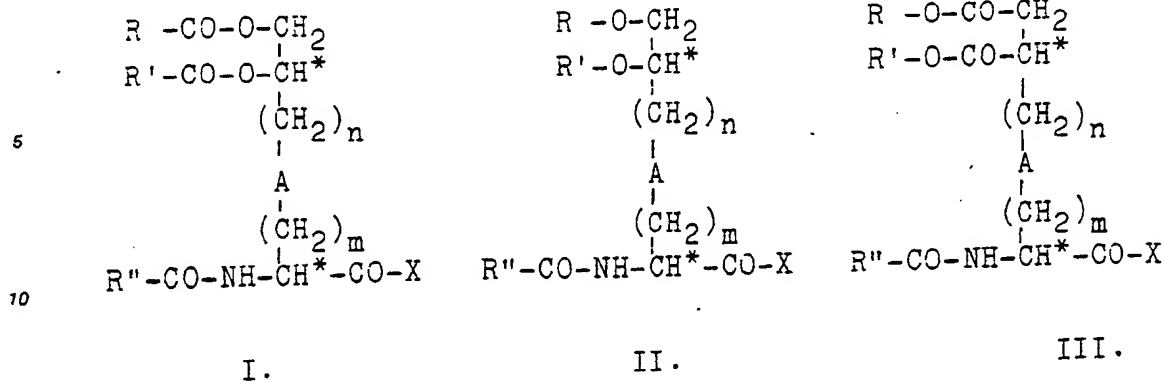
1. Synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Klauenseuche-Virus besteht.

2. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Membranankerverbindung und einer Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus, die kovalent miteinander verknüpft sind, besteht.

3. Synthetische Vakzine gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.

4. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung eine der nachstehenden Formeln aufweist





in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH<sub>2</sub>-) oder -NH- sein kann;  
 n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

45 C\* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration,

R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen ist, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>- (substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die die Partialsequenz des Virus gebunden ist.

5. Synthetische Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus, die an die Membranankerverbindung gebunden ist,  
 55 ausgewählt ist aus der Gruppe

Sequenz-(134-154)

" -(135-154)

" -(134-158)

5 " -(134-160)

" -(141-160)

" -(141-158)

10 " -(200-213)

" -(200-210)

" -(161-180),

15

oder deren C-terminal amidierter oder alkylamidierter Formen, wobei die Sequenzen aller bekannten Serotypen und Subtypen verwendet werden können.

6. Synthetische Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus VP 1 (135-154) an die Membranankerverbindung  
20 gebunden ist.

7. Synthetische Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Mischung von Peptiden aus verschiedenen Sero- und/oder Subtypen des Maul- und Klauenseuche-Virus besteht, die jeweils kovalent an die Membranankerverbindung oder Membranankerverbindungen gebunden sind.

8. Synthetische Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einer Mischung von Sequenzen VP1 134 - 160 der Serotypen O, A oder C gebunden an die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-serin besteht.

9. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzine aus N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-seryl VP 1 (135-154) besteht, wobei die Membranankerverbindung als R,S-, R,R-Diastereomeres oder als Diastereomerengemisch  
30 vorliegen kann.

10. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung als R,R-Diastereomeres vorliegt.

11. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche  
35 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, daß die in an sich bekannter Weise hergestellten Partialsequenzen des Maul- und Klauenseuche-Virus durch eine Konjugationsreaktion an die Membranankerverbindung gebunden werden.

12. Pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 11 gegebenenfalls neben  
40 üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen, Adjuvantien und/oder weiteren Vakzinen.

13. Verwendung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 12 zur Erzeugung von Antikörpern gegen Maul- und Klauenseuche-Viren in Säugetieren.

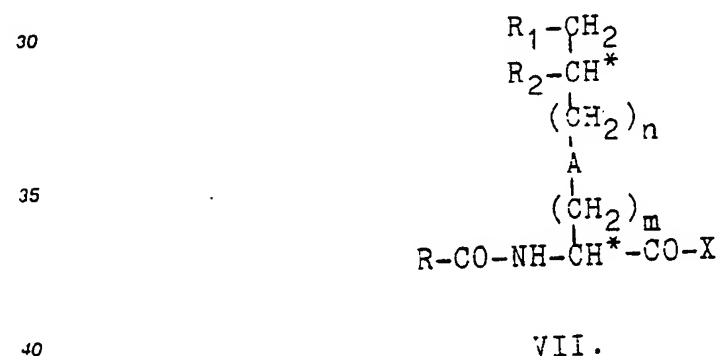
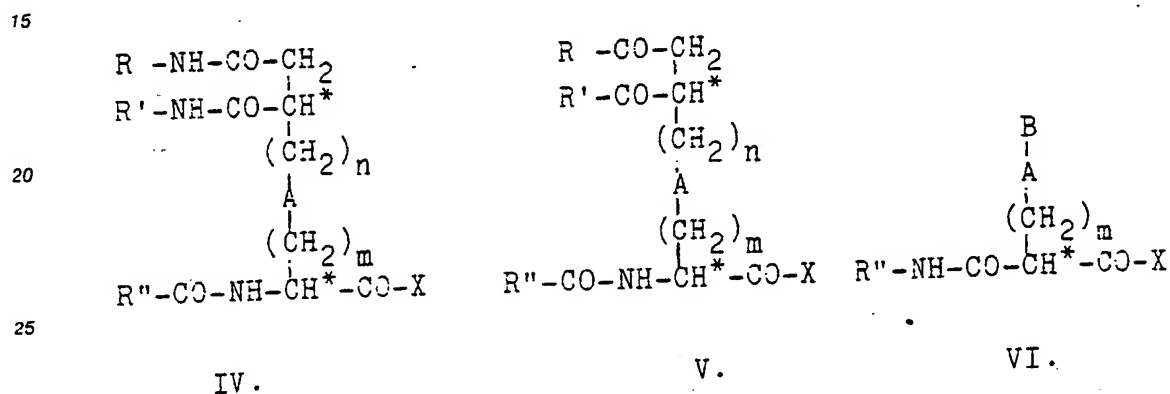
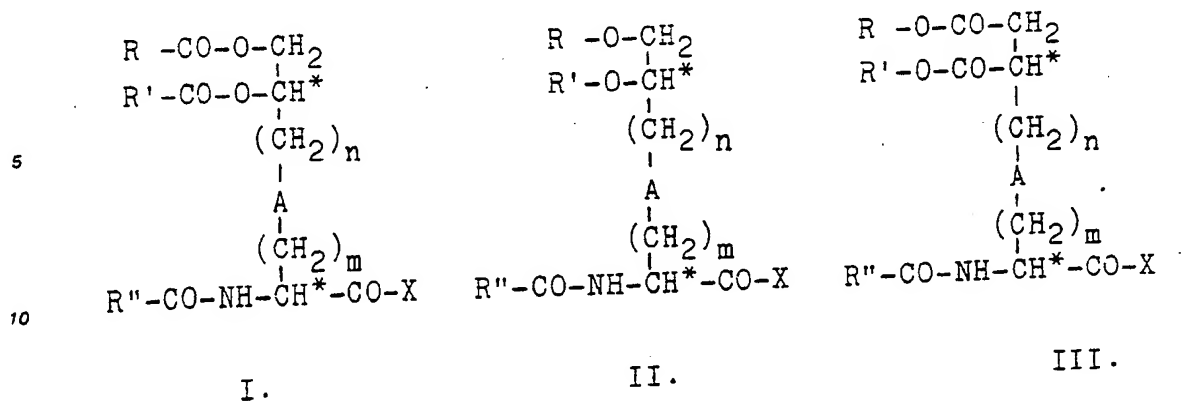
45 Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Membranankerverbindung durch eine Konjugationsreaktion mit mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Klauenseuche-Virus verbunden wird.

2. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Membranankerverbindung und eine Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus kovalent miteinander verknüpft werden.

3. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.

4. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1  
55 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung eine der nachstehenden Formeln aufweist



in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH<sub>2</sub>-) oder -NH- sein kann;  
 n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

45 C\* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration,  
 R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe  
 mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen ist, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen  
 substituiert sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-  
 (substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> gleich oder verschieden sind und dieselben  
 50 Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR-, -O-COR-, -COOR-, NHCOR oder -CONHR sein  
 können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die die Partialsequenz des Virus gebunden  
 ist.

5. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 -  
 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus, die an die Mem-  
 55 branankerverbindung gebunden ist, ausgewählt ist aus der Gruppe

Sequenz-(134-154)

" -(135-154)

" -(134-158)

" -(134-160)

" -(141-160)

" -(141-158)

" -(200-213)

" -(200-210)

" -(161-180),

oder deren C-terminal amidierter oder alkylamidierter Formen, wobei die Sequenzen aller bekannten Serotypen und Subtypen verwendet werden können.

6. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Partialsequenz des Maul- und Klauenseuche-Virus VP 1 (135-154) an die Membranankerverbindung gebunden ist.

7. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mischung von Peptiden aus verschiedenen Sero- und/oder Subtypen des Maul- und Klauenseuche-Virus jeweils kovalent an die Membranankerverbindung oder Membrananker-  
verbindungen gebunden wird.

8. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Mischung von Sequenzen VP1 134 - 160 der Serotypen O, A oder C an die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-s-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-serin gebunden wird.

9. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]-cysteinyl-seryl-serin VP 1 (135-154) gebildet wird, wobei die Membranankerverbindung als R,S-, R,R-Diastereomeres oder als Diastereomeregemisch vorliegen kann.

10. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung als R,R-Diastereomeres vorliegt.

11. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen oder veterinärmedizinischen Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß eine synthetische Vakzine hergestellt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 10 mit üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen, Adjuvantien und/oder weiteren Vakzinen in an sich bekannter Weise in eine zur Verabreichung geeignete Form gebracht wird.

12. Verwendung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 10 zur Erzeugung von Antikörpern gegen Maul- und Klauenseuche-Viren in Säugetieren.



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 338 437 A3**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 89106628.4

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>: **C07K 7/00, A61K 37/02**

(22) Anmeldetag: 13.04.89

(30) Priorität: 22.04.88 DE 3813821

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
25.10.89 Patentblatt 89/43

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE**

(88) Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 08.05.91 Patentblatt 91/19

(71) Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**  
Postfach 80 03 20  
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: **Wiesmüller, Karl-Heinz**  
**Rappenhalde 33**  
**W-7400 Tübingen(DE)**  
Erfinder: **Hess, Günter, Dr. Dr.**  
**Ravensteynstrasse 75**  
**W-4500 Koblenz(DE)**  
Erfinder: **Jung, Günther, Prof. Dr.**  
**Ob der Grafenhalde 5**  
**W-7400 Tübingen(DE)**

(54) **Synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche und Verfahren zu deren Herstellung.**

(57) Eine synthetische Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche wird gebildet durch Konjugation mindestens einer Membranankerverbindung mit mindestens einer Partialsequenz eines Proteins des Maul- und Klauenseuche-Virus. Die genannte Vakzine hat den Vorteil, daß sie auch ohne Kühlung sehr lange haltbar ist und daß sie aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit bereits nach einmaliger Applikation einen ausreichenden Schutz gegen die Maul- und Klauenseuche erzeugt.

EP 0 338 437 A3



Europäisches  
Patentamt

**EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,**  
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
Übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 6628

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE		
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch
Y, D	EP-A-0 210 412 (HOECHST)  * Seite 3, Zeile 16 - Seite 5, Zeile 7; Seite 7, Zeile 31 - Seite 8, Zeile 23; Seite 44, Zeile 30 - Seite 45, Zeile 14; Ansprüche 4, 19 *  --	1-8, 11-12
Y	PEPTIDES - PROCEEDINGS OF THE 10th AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM, St. Louis, 23.-28. Mai 1987, Seiten 553-554, ESCOM, Leiden, NL; A.YU. SUROVOY et al.: "Mimicking protective epitopes of foot and mouth disease virus with synthetic peptides"  * Insgesamt *  --	1-8, 11-12
		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
		C 07 K A 61 K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE		
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 13 Nicht recherchierte Patentansprüche: Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (Siehe Art. 52(4) des Europäischen Patentübereinkommens)</p>		
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer
DEN HAAG	25-01-1991	KORSNER
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument &amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>		



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 89 10 6628

-2-

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
Y	EXPERIENTIA, Band 42, 1986, Seiten 521-531, Birkhäuser Verlag, Basel, CH; G.H. WERNER et al.: "Immunomodulating peptides"  * Seite 522, (Lipopeptides)- Seite 524, Spalte 1 *	1-8, 11-12	
A	SYMPOSIUM ON SYNTHETIC PEPTIDES AS ANTIGENS, London, 4.-6. Juni 1985, Seiten 184-199, Wiley & Sons, Chichester, GB; M. SELA et al.: "Synthetic peptides with antigenic specificity for bacterial toxins"  * Seite 184 (Zusammenfassung); Seiten 186-187 (Synthetische Vakzine); Seite 192, Spalte 1 und Figur 4; Seite 197, Spalte 2 - Seite 198, Spalte 1 *	1	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
A	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Band 82, Januar 1985, Seiten 178-182, Washington, US; H.M. GEYSEN et al.: "Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein"  * Seite 179, Figur 1 *	1-12	
X,P	VACCINE, Band 7, Februar 1989, Seiten 29-33, Butterworth & Co. Ltd, Guildford, GB; K.-H. WIESMULLER et al.: "Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator"  * Insgesamt *	1-12	